

明 細 書

毛髪 of 太毛化 of 方法及び組成物

技術分野

本発明は毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（FGF-7）の発現を亢進させることにより毛髪 of 太毛化を維持・促進する方法、及びFGF-7の発現を亢進させる組成物、特に毛髪 of 太毛化を維持・促進するための頭皮外用剤に関する。

背景技術

高齢化社会、ストレス社会といわれる現代社会では、頭部毛髪が様々な原因により脱毛の危機にさらされる機会がますます多くなっている。これに対応して、より優れた「育毛料」を提供すべく様々な試みがなされている。育毛料が毛髪に与える効果として主なものに、1)発毛誘導効果（発毛促進効果、成長期誘導効果）、2)毛髪 of 太さを維持する又はその太さを太くする、即ち、太毛化効果、3)毛髪成長期延長効果、4)5 α -レダクターゼ阻害効果（退行期早期移行抑制効果）、5)血行促進効果、6)殺菌効果、7)フケ防止効果、8)保湿効果、9)抗酸化効果等が挙げられる。

男性型脱毛は、毛髪成長期の短縮により毛包が矮小化し、毛髪径が次第に減少してうぶ毛に変化することによって特徴づけられ、男性型脱毛者では、毛髪密度（単位面積当たりの毛髪数）の減少はほとんど認められないのに対し、毛髪径が極端に減少するという事実が見出されている（特開2002-322094号公報）。この事実に基づき、発毛誘導のみならず、上記太毛化効果の重要性にも注

目されている。

しかしながら、毛髪の太毛化にどのようなメカニズムが関与しているかについては生化学・分子生物学レベルにおいて未だ解明に至っておらず、その結果、太毛化の維持・促進に有効な薬剤を含有する育毛料の研究・開発も模索段階にあるといえよう。毛髪の太毛化のメカニズムが十分に解明できれば、既存の育毛料に比べ一層顕著な効果を奏するものの提供が可能となり得る。

発明の開示

本発明は、毛髪の太毛化のメカニズムの生化学レベルでの解明、さらには毛髪の太毛化を維持・促進する方法及びそのための皮膚外用組成物の提供を課題とする。

F G F - 7 は 1 9 4 個のアミノ酸から成る糖蛋白質で、線維芽細胞増殖因子のファミリーに属する成長因子の一つである。間葉系細胞である皮膚線維芽細胞などで分泌され、表皮細胞に存在する特異的レセプターである F G F R 2 III b に結合してパラクラインにその増殖を促進することはよく知られた事実である (Rubin J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:802-806; Marchese C ら、J. Cell Physiol. 1990, 144:326-332など)。また、表皮ケラチノサイトのみならず、肝実質細胞、腸管上皮細胞 (Houseley R. M ら、J. Clin. Invest. 1994, 94:1764-1777) など広く上皮系細胞の増殖を促進し、毛包のケラチノサイトもこの F G F - 7 により増殖が促進されることが示されている (Pierce G. F. ら、J. Exp. Med. 1994, 179:831-840)。また、マウスの実験から F G F - 7 が成長期の毛乳頭細胞で発現し、その機能表現に必須であるレセプター F G F R 2 が毛乳頭近傍の毛母で発現していることが示され (Dev. Dyn. 1996; 205(4):379-386)、毛成長に F G F - 7 が関与してい

ることが示唆されている。しかしながら、F G F - 7 が毛成長においてどのような役割を果たしているかは解明されていない。そこで我々は、毛乳頭細胞においてF G F - 7 の発現を亢進させれば、そのターゲット細胞と考えられる毛母細胞などの増殖を介して、毛髪成長期延長作用による太毛化につながるのではないかという作業仮説を立てた。

まず、様々な薬剤を毛乳頭細胞などに作用させてF G F - 7 の発現を上昇させるものを探索したところ、アデノシン及びその誘導体がF G F - 7 遺伝子の発現を亢進させることがわかった。次に、アデノシンについての臨床試験を行ったところ、驚くべきことに太毛化効果をも有することが見出された。太毛化の維持・促進には特開2002-322094号公報に記載の通り、毛髪成長期延長により毛成長促進作用効果を発揮する成分（例えばクララ属植物エキス）、退行期への早期移行を抑制することにより脱毛防止作用効果を発揮する成分（例えばテストテロン）、及び休止期から成長期に至る誘導作用効果を発揮する成分（例えば、デシルテトラデシルアミンオキシド）の少なくとも3種の成分が必要であると考えられていたため、単独化合物がこのような効果を奏することは驚くべきことである。

F G F - 7 の毛乳頭細胞などにおける発現が亢進されるといった事実は初めて見出されたものであり、ましてやその発現の亢進が毛髪の太毛化に関与するといった事実は全く初めて見出されたものである。

従って、本発明は、毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（F G F - 7）の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法を提供する。

毛包の細胞におけるF G F - 7 の発現の亢進は、アデノシン及び

その誘導体、例えば、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、並びに C C P A (2 - クロロ - N⁶ - シクロペンチルアデノシン)、C I - I B - M E C A (2 - クロロ - N⁶ - (3 - ヨードベンジル) - 9 - [5 - (メチルカルバモイル) - β - D - リボフラノシル] アデニン) 及び N E C A (N - エチルカルボキシアミドアデノシン) から成る群から選ばれる毛包の細胞における F G F - 7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤 (以下、「F G F - 7 発現亢進剤」と称する場合がある) を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより達成される。好ましくは、前記薬剤はアデノシンである。

別の観点において、本発明は、アデノシン及びその誘導体、例えば、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、並びに C C P A、C I - I B - M E C A 及び N E C A から成る群から選ばれる薬剤を活性成分として含有する F G F - 7 発現亢進組成物を提供する。

好適な態様において、F G F - 7 の発現が亢進されるのは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である。

好適な態様において、前記薬剤はアデノシンである。

好適な態様において、前記組成物は頭皮に塗布することにより毛髪の太毛化を維持・促進させる皮膚外用剤である。

更なる別の観点において、本発明は毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニング方法であって、候補薬剤を細胞、好ましくは毛包の細胞、より好ましくは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞に適用し、当該細胞の F G F - 7 の発現を亢進させる薬剤を選定することを特徴とする方法を提供する。好ましくは、毛乳頭細胞は不死化毛乳頭細胞である。

好適な態様において、上記細胞の F G F - 7 の発現の亢進は、細

胞中の F G F - 7 の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記測定は F G F - 7 に特異的な抗体を利用する ELISA 法又は RIA 法による。

さらに好適な態様において、上記細胞の F G F - 7 の発現の亢進は、細胞から抽出された F G F - 7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記 mRNA の測定は R T - P C R 法（逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応法）により行う。

本発明は、毛髪の太毛化の維持・促進に効果的な方法及びそのための組成物の提供を可能にする。

図面の簡単な説明

図 1 は、毛乳頭細胞におけるアデノシンの F G F - 7 発現亢進効果を、F G F - 7 発現量（相対値）として示す。

図 2 は、毛乳頭細胞におけるアデノシンの F G F - 7 発現亢進効果を、薬剤添加 3 時間後の F G F - 7 相対発現量として示す。

図 3 は、毛乳頭細胞におけるアデノシン類縁物質の F G F - 7 発現亢進効果を、薬剤添加 2 時間後の F G F - 7 相対発現量として示す（R e a l T i m e P C R : n = 4）。

図 4 は、毛乳頭細胞におけるフラバノンの F G F - 7 発現亢進効果を、薬剤添加 2 時間後の F G F - 7 相対発現量として示す（R e a l T i m e P C R : n = 4）。

図 5 は、毛乳頭細胞における 3 , 4 ' - ジメチルフラバノンの F G F - 7 発現亢進効果を、薬剤添加 2 時間後の F G F - 7 相対発現量として示す（R e a l T i m e P C R : n = 3）。

図 6 は、毛乳頭細胞における 3 - メチルフラバノンの F G F - 7 発現亢進効果を、薬剤添加 2 時間後の F G F - 7 相対発現量として

示す (Real Time PCR : n = 4) 。

図 7 は、アデノシン含有育毛料の太毛化効果 (80 μ m 以上の太毛率) を示す。

図 8 は、ヒト不死化毛乳頭細胞におけるアデノシンの FGF-7 発現亢進効果を、薬剤添加 2 時間後の FGF-7 相対発現量として示す。

図 9 は、外毛根鞘細胞におけるアデノシンの FGF-7 発現亢進効果を、薬剤添加 3 時間後の FGF-7 相対発現量として示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明は、毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子 (FGF-7) の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法を提供する。

本発明でいう太毛化とは、一般に毛根の矮小化によるうぶ毛化が抑制され、毛髪の太さが維持される又は太くなることをいう。太毛化効果の有無の判定は、毛髪の太さや質に個人差があり、従って個人別にされることが好ましいが、一般には、頭部の所定面積の領域、例えば 1 cm^2 、2 cm^2 、5 cm^2 における所定の直径の毛髪、例えば直径 40 μ m、60 μ m、80 μ m 又は 100 μ m 以上の毛髪の本数が、本発明に係る FGF-7 発現亢進剤の頭皮への適用、例えば 1 ヶ月、3 ヶ月、又は 6 ヶ月以上の継続的な適用の結果、実質的に減少しなかった場合、例えばその減少率が 10 % 未満、好ましくは 5 % 未満の場合、太毛が維持されたと判定され、例えば直径 40 μ m、60 μ m、80 μ m 又は 100 μ m の毛髪の本数が実質的に増加した場合、例えばその増加率が 5 % 以上、好ましくは 10 % 以上、より好ましくは 20 % 以上の場合、太毛化が促進されたも

のと判定できる。

毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞における F G F - 7 の発現の亢進は、アデノシン及びその誘導体、例えば、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、並びに C C P A、C 1 - I B - M E C A 及び N E C A から成る群から選ばれる毛包の細胞における F G F - 7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより達成される。

アデノシンは、リボヌクレオシドの一つで塩基部分にプリン誘導体であるアデニンを含むものである。アデノシン 5' - リン酸は、5' - アデニル酸とも呼ばれ、アデノシンのリボースの 5' 位のヒドロキシル基にリン酸が 1 分子結合したヌクレオチドである。

また、アデノシン 5' - リン酸の塩において、塩を形成する対イオンとしては、酸と対イオンを形成する物質であればいずれの物質でもよく、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム等を挙げることができる。また、アデノシン 5' - リン酸の塩としては、その水和物を使用することもできる。

C C P A、C 1 - I B - M E C A、N E C A はアデノシン類縁物質である。C C P A、C 1 - I B - M E C A、N E C A はシグマ社から入手できる。

上記アデノシン、アデノシン 5' - リン酸及びアデノシン 5' - リン酸の塩、C C P A、C 1 - I B - M E C A 及び N E C A は試薬として市販されているものを使用することができる。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物は、皮膚外用剤、好ましくは頭皮外用剤、例えば育毛料又は養毛料であり得る。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物は、上記 F G F - 7 発現亢進剤を全量中、例えば 0.01 ~ 20.0 質量%、好ましくは 0.1 ~ 10.0 質量%で含む。この配合量が当該組成物の全量の 0

． 0 1 質量％未満では上記成分による太毛化効果が十分に発揮されないため好ましくなく、また 2 0 . 0 質量％を超えると調剤上支障をきたす傾向が顕著となり、好ましくない場合がある。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は、皮膚に直接に塗布または散布する経皮投与により投与することができる。また、その投与量は、外用剤の具体的態様、使用者の年齢、症状等により変化するので明確には特定することはできないが、ヒトに投与する場合、上記 F G F - 7 発現亢進剤が、体重 1 Kg および 1 日当り、一般に 0 . 0 1 ~ 1 0 0 . 0 mg、好ましくは 0 . 1 ~ 1 0 . 0 mg 投与されるような量であり、この量を 1 日 1 回又は 2 ~ 4 回に分けて投与することが好ましい。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は、ヒトを始めとする哺乳動物において、優れた太毛化維持・促進作用を示し、ヘアーケア用の医薬品、医薬部外品又は化粧品として有用である。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤が採り得る剤型は、好ましくは外皮に適用可能な外用剤の剤型、例えば、液状、乳液状、クリーム状、エアゾール状等の剤型を選択することができる。また、本発明の組成物の形態も任意であり、例えば、トニック、ヘアークリーム、ムース、シャンプー、リンス、乳液、化粧水、パック、エアゾール剤等の形態を採ることができる。本発明の組成物は外皮に塗布して使用するのが特に好ましい。塗布方法は特に限定されるものではないが、例えば頭皮に 1 日 1 回以上、例えば 1 日 1 から 3 回、塗布する皮膚面積に応じて適量、例えば 1 ~ 5 m l 塗布するのが好ましい。

本発明に係る F G F - 7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤においては、必須成分である上記香料に加えて、必要に応じて、かつ本発

明の所期の効果を損なわない限り、化粧品、医薬部外品、医薬品等において一般的に用いられる、各種の油性又は水性成分、保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、香料、色剤、各種の薬剤等を配合することができる。

例えば、高級脂肪酸、固形パラフィン、流動パラフィン、シリコーン油、スクワラン、モノオレイン酸グリセリル、オリーブ油、イソプロピルミリステート、高級アルコール等の油分；グリセリン、ヒアルロン酸、プロピレングリコール、マルチトール、アテロコラーゲン、乳酸ナトリウム等の保湿剤；マルメロ粘質物、カルボキシビニルポリマー、キサントガム等の増粘剤；ニコチン酸アミド、ニコチン酸ベンジル、ビタミンEアセテート、センブリ抽出物、塩化カルプロニウム、アセチルコリン誘導体等の血管拡張剤；セリン、メチオニン、アルギニン等のアミノ酸類；ビタミンB6、ビタミンE類、ビオチン、パントテン酸類等のビタミン類；ニコチン酸、ニコチン酸メチル、ニコチン酸トコフェロール等のニコチン酸エステル類；セファランチン等の皮膚機能亢進剤；エストラジオール等の女性ホルモン剤；グリチルリチン酸、グリチルレチン酸、アズレン等の消炎剤；ヒノキチオール、ヘキサクロロフェン、ベンザルコニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリド、ウンデシレン酸、トリクロロカルバニリド、ビチオノール等の抗菌剤；メントール等の清涼剤；サリチル酸、亜鉛類、乳酸類等；クエン酸等の有機酸類を配合することができる。

本発明に係るFGF-7発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は更に上記FGF-7発現亢進剤以外で育毛作用が認められている、既知の育毛成分、例えばミノキシジル、サイクロスポリン等を加えることにより、さらに効果的な育毛効果が期待され得る。

本発明は更に毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニ

ング方法を提供する。この方法は、候補薬剤を細胞、好ましくは毛包の細胞、より好ましくは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞に適用し、当該細胞の FGF-7 の発現を亢進させる薬剤を選定することを特徴とする。

毛乳頭細胞として、ヒト由来の正常な毛乳頭細胞、あるいは入手が容易であり、しかも増殖速度が速い点で有利な不死化毛乳頭細胞、例えば特開平11-89565号公報に記載のとおり、SV40 large T 抗原遺伝子による形質転換により得られる不死化ヒト毛乳頭細胞などを使用することもできる。また、スクリーニングに際しては、毛乳頭細胞の他に、FGF-7 を産生する間葉系細胞、例えばヒトから単離される皮膚線維芽細胞や、他の毛包由来の細胞、例えば外毛根鞘細胞などを用いることもできる。

細胞中の FGF-7 発現の亢進は、例えば細胞中の FGF-7 の量を測定することにより決定される。好ましくは、この測定はヒト FGF-7 に特異的な抗体を利用し、当業界において周知の方法、例えば蛍光物質、色素、酵素等を利用する免疫染色法、ウェスタンブロット法、免疫測定方法、例えば ELISA 法、RIA 法等、様々な方法により実施できる。また、細胞から RNA を抽出し、ヒト FGF-7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定することもできる。mRNA の抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えば RNA の定量は逆転写反応後、定量ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) により行われる。例えば、定量 PCR は以下のプライマーの組み合わせを利用して実施できる。

組み合わせ 1

Forward Primer : 5' -CATGAACACCCGGAGCACTAC-3' (NM_002009:419-439) (配列番号 1)

Reverse Primer : 5' -CACTGTGTTTCGACAGAAGAGTCTTC-3' (NM_00200

9:669-646) (配列番号 2)

P C R 産物の大きさ : 251bp

組み合わせ 2

Forward Primer : 5' -CACAAATGGATACTGACATGGA-3' (NM_002009: 449-470) (配列番号 3)

Reverse Primer : 5' -TCACTCTTATATCCCCTCCTTC-3' (NM_002009: 644-623) (配列番号 4)

P C R 産物の大きさ : 196bp (J Clin Endocrinol Metab 88(2), 773-, 2003)

組み合わせ 3

Forward Primer : 5' -CTTTGCTCTACAGATCATGCTTTC-3' (NM_002009: 480-503) (配列番号 5)

Reverse Primer : 5' -TTGCCATAGGAAGAAAGTGGGCTG-3' (NM_002009: 1022-999) (配列番号 6)

P C R 産物の大きさ : 543bp (J Clin Invest 92, 2408-, 1993)

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、この実施例により、本発明の技術的範囲が限定的に解釈されるべきものではない。なお、以下の実施例等で、配合量を表す数値は、特に断わらない限り、配合される対象全体に対する質量%で表される。

実施例

実験 1 : 定量 P C R 実験による F G F - 7 の発現亢進の検討(1)

1) 細胞の培養

ヒト毛乳頭細胞 (dermal papillae cell; D P C) は整形手術の副産物として生じたヒト頭皮より単離・培養後凍結保存しておいた 34 歳女性由来の D P C を用いた。細胞密度が $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/cm² になるように播種し、MEM(GIBCO)+10% F B S 中、37℃、5%CO₂ の

条件下で培養した。2回/週の割合で培地交換を行い、細胞が集密に達したときは（播種から10日～20日後）0.25%トリプシンで細胞をディッシュから剥がして回収し、再び $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/cm²の密度で播種した。

2) 培養細胞の薬剤処理

解凍後1-3回継代・培養したD P Cを24ウェルプレートに 4.0×10^4 個/ウェルの密度で播種し、4日後、亜集密の細胞にアデノシンを $100 \mu\text{M}$ の濃度に溶解したMEM（血清無添加）に交換した。コントロール細胞は、MEM（血清無添加）のみを用い、同様に処理した。

3) R T - P C R

アデノシン添加の2、4、8、24時間後、MagNAPureLC(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で培養細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素SuperScriptII(Invitrogen)のキットを用いてcDNAを合成した。cDNAを鋳型にLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で二重鎖DNAの副溝に結合する蛍光色素CyberGreen Iを用いたリアルタイムPCRにより発現量の比較を行った。詳しくは、LightCycler-FastStart DNAマスターSYBR Green Iキット(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用い、添付のマニュアルに従って全量 $20 \mu\text{l}$ の反応液 (MgCl_2 2mM, Forward 及びReverse Primer各 $0.25 \mu\text{M}$) を調製し、LightCyclerでPCR反応（酵素活性化 $95^\circ\text{C}/10$ 分、熱変性 $95^\circ\text{C}/15$ 秒、アニーリング $58^\circ\text{C}/5$ 秒、伸長反応 $72^\circ\text{C}/10$ 秒、熱変性～伸長反応サイクルを40回）を行い、各サイクルの伸長反応終了時の蛍光強度をモニタリングした。この蛍光強度はその時点におけるPCR産物量を反映している。遺伝子の発現量は、PCR産物の指数関数的増幅期において初期鋳型量AのPCR産物YがPCRのサイクル数Xに対して $Y=A \times 2^X$ を満たしながら

ら増幅されるものと仮定して、一定量の P C R 産物が得られるまでのサイクル数から相対値を算出した。以下に本研究で用いた F G F - 7 増幅用プライマーを示す。

Forward Primer : 5' -CATGAACACCCGGAGCACTAC-3' (NM_002009:419-439) (配列番号 1)

Reverse Primer : 5' -CACTGTGTTTCGACAGAAGAGTCTTC-3' (NM_002009:669-646) (配列番号 2)

P C R 産物の大きさ : 251bp

図 1 にその結果を示す。この図から明らかたとおり、アデノシンで処理された毛乳頭細胞において F G F - 7 の発現の顕著な亢進が認められた。

実験 2 : 定量 P C R 実験による F G F - 7 の発現亢進の検討(2)

実験 1 と同様にして、但しアデノシンの濃度を $10 \mu\text{M}$ 及び $100 \mu\text{M}$ の二通りとし、アデノシン処理時間を 3 時間として、R T - P C R 実験を行った。その結果を図 2 に示す。この図から明らかたとおり、アデノシンで処理された毛乳頭細胞において F G F - 7 の発現が、アデノシン濃度依存的に亢進することが確認された。

実験 3 - 1 : 定量 P C R 実験による F G F - 7 の発現亢進の検討(3)

実験 1 と同様にして、但しアデノシンの代わりにアデノシン類縁物質である C C P A (2-クロロ-N⁶-シクロペンチルアデノシン) ($100 \mu\text{M}$)、C 1 - I B - M E C A (2-クロロ-N⁶-(3-ヨードベンジル)-9-[5-(メチルカルバモイル)- β -D-リボフラノシル]アデニン) ($50 \mu\text{M}$) 又は N E C A (N-エチルカルボキシアミドアデノシン) ($10 \mu\text{M}$) を用い、薬剤処理時間を 3 時間として、R T - P C R 実験を行った。(尚、薬剤の溶解性が低い場合には薬剤無添加のコントロールを含めた全ての

薬剤入り培地においてDMSO終濃度が0.1%となるよう調製してもよい。)

その結果を図3に示す。この図から明らかなとおり、CCPA、C1-IB-MECA又はNECAで処理された毛乳頭細胞においてもFGF-7の発現の顕著な亢進が認められた。

実験3-2：定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(4)

実験1と同様にして、但しアデノシンの代わりにフラバノン、3,4'-ジメチルフラバノン(YGU427)、3-メチルフラバノン(YGU429)をそれぞれ100 μ Mを用い、薬剤処理時間を2時間としてRT-PCR実験を施した。その結果を図4, 5, 6にそれぞれ示す。いずれもFGF-7遺伝子の発現亢進結果を示したが、アデノシンレセプターの阻害剤である8-SPT(8-スルフォニルテオフィリン)による阻害が認められないことから、FGF-7の発現亢進には必ずしもアデノシンレセプターが必要ではないことを示す。

実験4：アデノシンの毛髪に対する太毛化効果の検討

以上のFGF-7亢進効果の見出された各種薬剤のうち、アデノシンを、毛髪の太毛化効果について以下の方法で検討した。

下記の組成1を有するアデノシン含有育毛料及びコントロールとして下記の組成2を有するニコチン酸アミド含有育毛料を、30～50歳の男性型脱毛を呈する男性被験者(各群51名)の皮髪頭部に対し1日2回、適量(約2～3ml)にて6ヶ月間にわたり塗布使用し、使用開始時との比較におけるアデノシンの太毛化効果について調べた。本実験においては、うぶ毛は40 μ m未満の直径を有する毛髪とし、直径60 μ m以上のものを太毛とし、直径80 μ m以上のものは顕著に太毛化した毛髪とした。アデノシン含有育毛

料を使用してから 6 ヶ月目において、使用開始時と比べ、うぶ毛は 7 % 以上減少し、また直径 60 μm 以上の太毛は 10 % 以上増加した。更に、直径 80 μm 以上の太毛は 5 % 以上増加した。アデノシン含有育毛料を継続的に使用すると、ニコチン酸アミド含有育毛料を使用したときと比べ、これらの太毛の増加量が顕著に高かった。その結果を図 7 に示す。

尚、アデノシン含有育毛料とニコチン酸アミド含有育毛料の毛髪密度に対する効果を調べたところ、両者の間に統計学的に有意な差は認められなかった（データーは示さない）。従って、培養毛乳頭細胞において FGF-7 発現亢進効果を示すアデノシンが特に毛髪の太毛化の維持・促進に有効であることが明らかとなった。

アデノシン含有育毛料（組成 1）

成分	配合量（質量％）
アデノシン	0.75
イソステリルアルコール	0.50
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.50
ビニルピロリドン-N, N-ジメチル	
エチルメタクリル酸共重合体ジエチル硫酸塩液	0.50
ジプロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	残量
D L-リンゴ酸	適量

ニコチン酸アミド含有育毛料（組成 2）

成分	配合量（質量％）
ニコチン酸アミド	0.10
イソステリルアルコール	0.50
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.50

ビニルピロリドン-N, N-ジメチル	
エチルメタクリル酸共重合体ジエチル硫酸塩液	0.50
ジプロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	残量
D L-リンゴ酸	適量

実験5：定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(4)

実験1と同様に、但しDPCとしてヒト不死化毛乳頭細胞（特開平11-89565号公報に記載のSV40 large T抗原遺伝子による形質転換により得られる不死化ヒト毛乳頭細胞）を用い、薬剤処理時間を2時間として、RT-PCR実験を行った。

その結果を図8に示す。この図から明らかなとおり、毛乳頭細胞としてヒト不死化毛乳頭細胞を用いても、アデノシンによるFGF-7の発現の亢進が確認された。従って、FGF-7発現亢進剤のスクリーニングにおいて、ヒト不死化毛乳頭細胞を用いることもできることが明らかとなった。

実験6：定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(5)

1) 細胞の培養

ヒト外毛根鞘細胞（outer root sheath cell:ORS）は整形手術の副産物として生じたヒト頭皮より単離・培養後凍結保存しておいた40歳女性由来のORSを用いた。細胞密度が $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/ cm^2 になるように播種し、K-SFM培地(GIBCO)中、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で培養した。P3のORSを24ウェルプレートに 2.0×10^4 個/ウェルの密度で播種して3日後、亜集密の細胞にアデノシンを10又は100 μM の濃度に溶解したKBM培地（クラボウ）に交換した。コントロール細胞は、KBM培地のみを用い、同様に処理した。RT-PCRは実験1と同様に行った。

図 9 にその結果を示す。この図から明らかとなっており、アデノシンで処理された外毛根鞘細胞においても、毛乳頭細胞と同様、FGF-7 の発現の顕著な亢進が認められた。

産業上の利用可能性

本発明は、毛髪の太毛化の維持・促進に効果的な方法及びそのための組成物の提供を可能にする。

請 求 の 範 囲

1. 毛包の細胞におけるケラチノサイト増殖因子 (F G F - 7) の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法。

2. アデノシン、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、C C P A (2 - クロロ - N⁶ - シクロペンチルアデノシン)、C I - I B - M E C A (2 - クロロ - N⁶ - (3 - ヨードベンジル) - 9 - [5 - (メチルカルバモイル) - β - D - リボフラノシル] アデニン) 及び N E C A (N - エチルカルボキシアミドアデノシン) から成る群から選ばれる、毛包の細胞における F G F - 7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより前記 F G F - 7 の発現を亢進させる、請求項 1 記載の方法。

3. 前記毛包の細胞における F G F - 7 の発現を亢進させる薬剤の少なくとも 1 種がアデノシンである、請求項 2 記載の方法。

4. 前記毛包の細胞が毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

5. アデノシン、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、C C P A、C I - I B - M E C A 及び N E C A から成る群から選ばれる薬剤を活性成分として含有する、F G F - 7 発現亢進組成物。

6. 前記薬剤の少なくとも 1 種の薬剤がアデノシンである、請求項 5 記載の組成物。

7. 頭皮に塗布することにより毛髪の太毛化を維持・促進させる皮膚外用剤である、請求項 5 又は 6 記載の組成物。

8. 毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニング方法

であって、候補薬剤を細胞に適用し、当該細胞の F G F - 7 の発現を亢進させる薬剤を選定することを特徴とする方法。

9. 前記細胞の F G F - 7 の発現の亢進が、細胞から抽出された F G F - 7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定される、請求項 8 記載の方法。

10. 前記細胞が毛乳頭細胞、不死化毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である、請求項 8 又は 9 記載の方法。

Fig.1

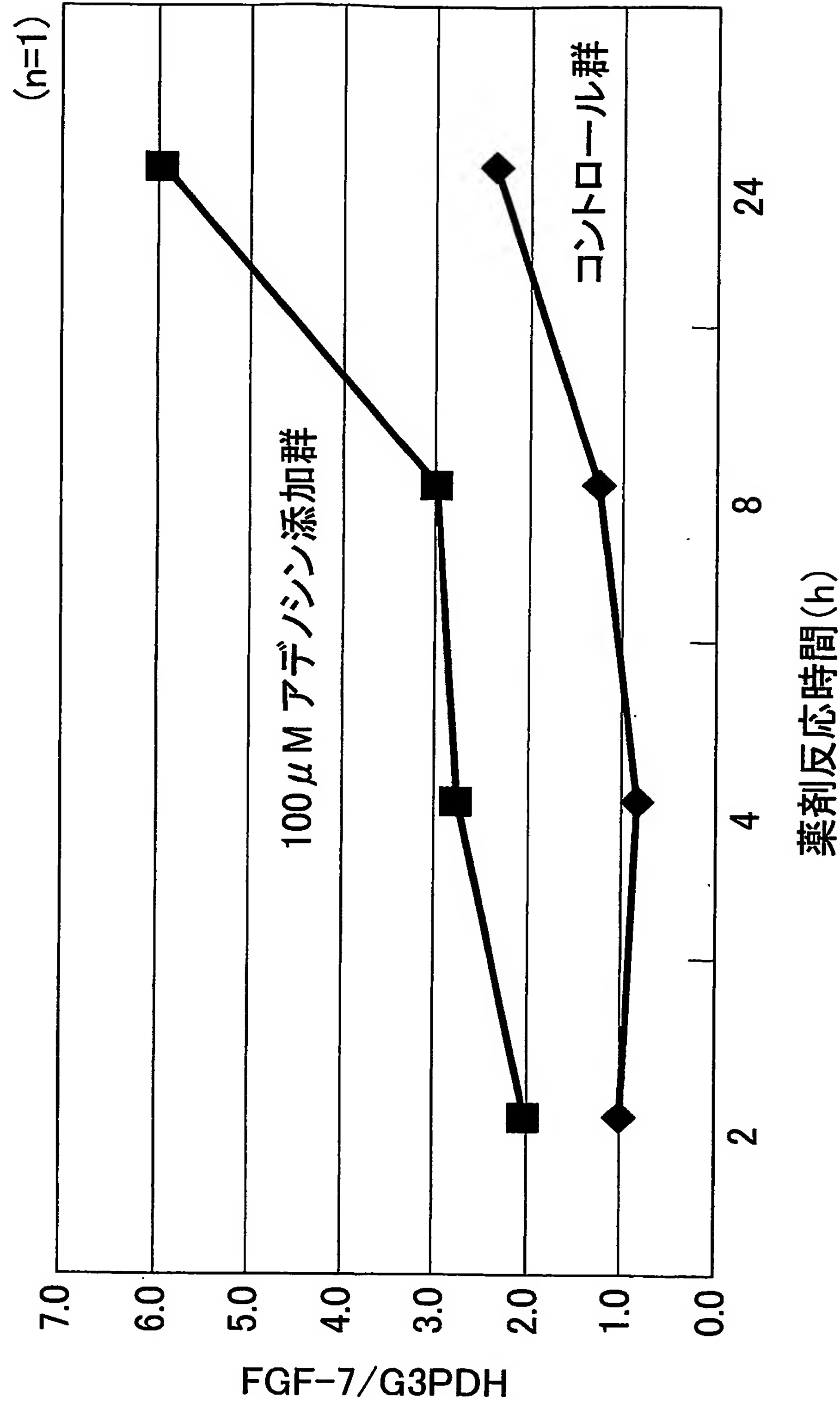


Fig.2

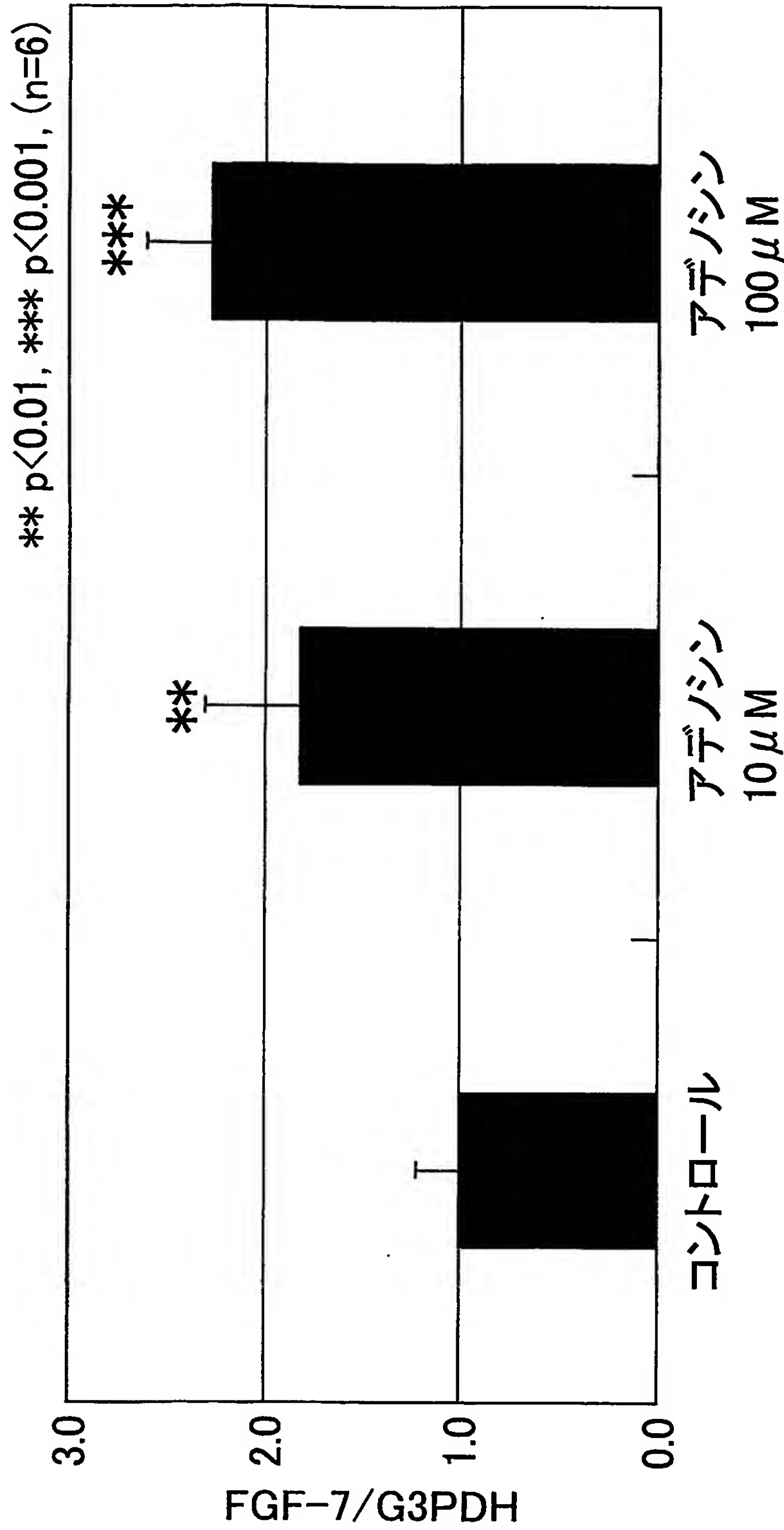


Fig.3

* p<0.05
** p<0.01

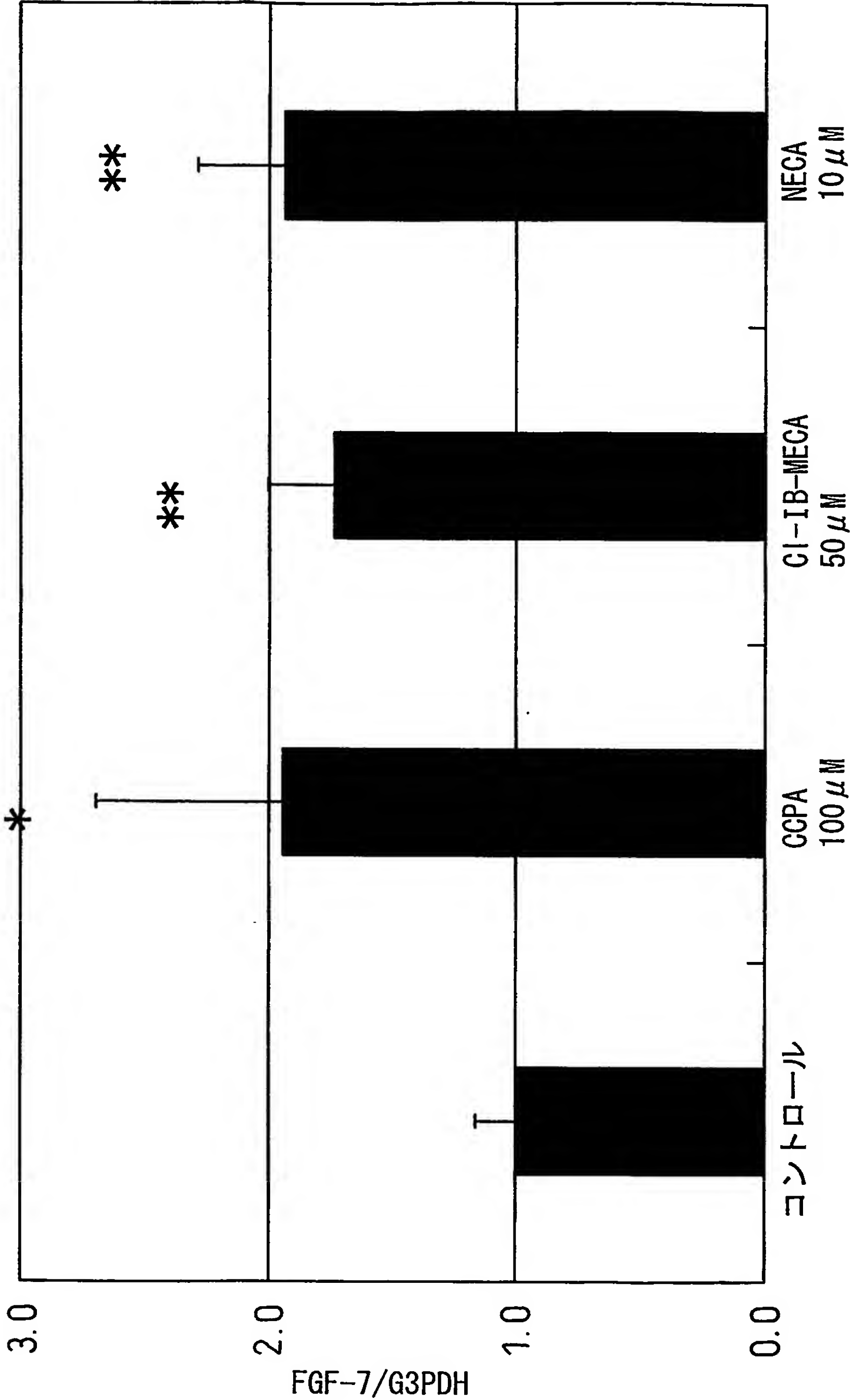


Fig.4

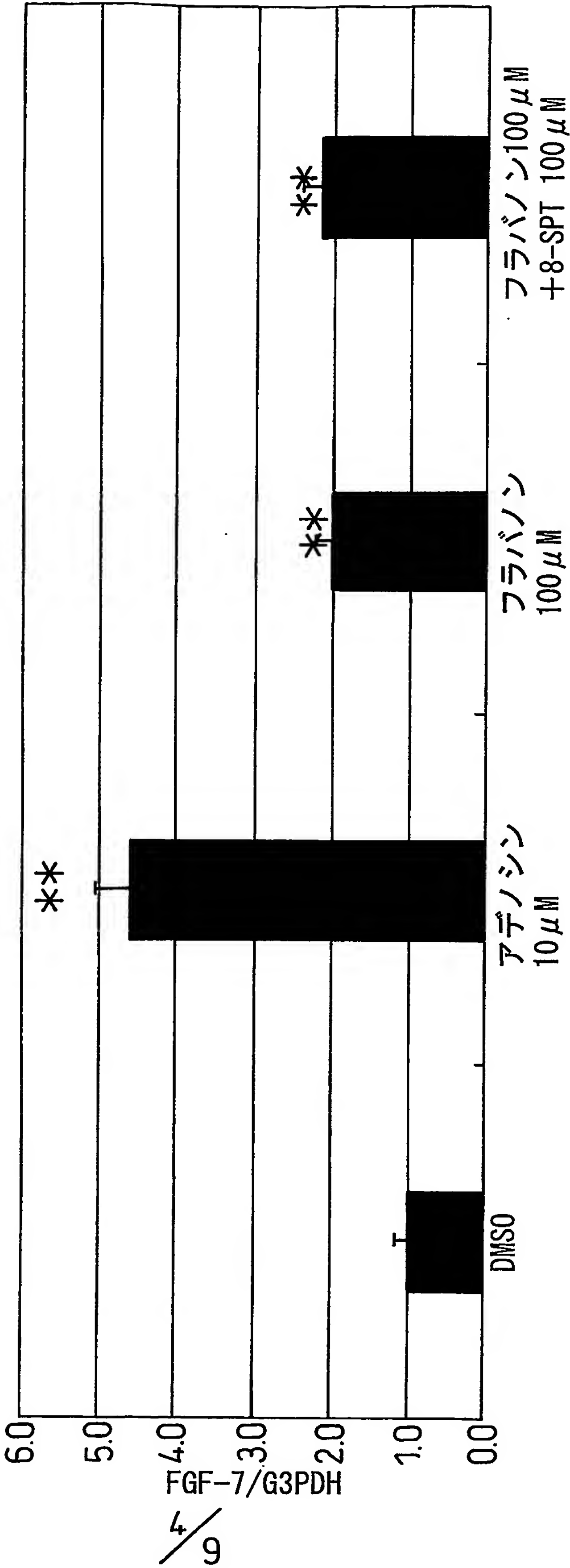


Fig.5

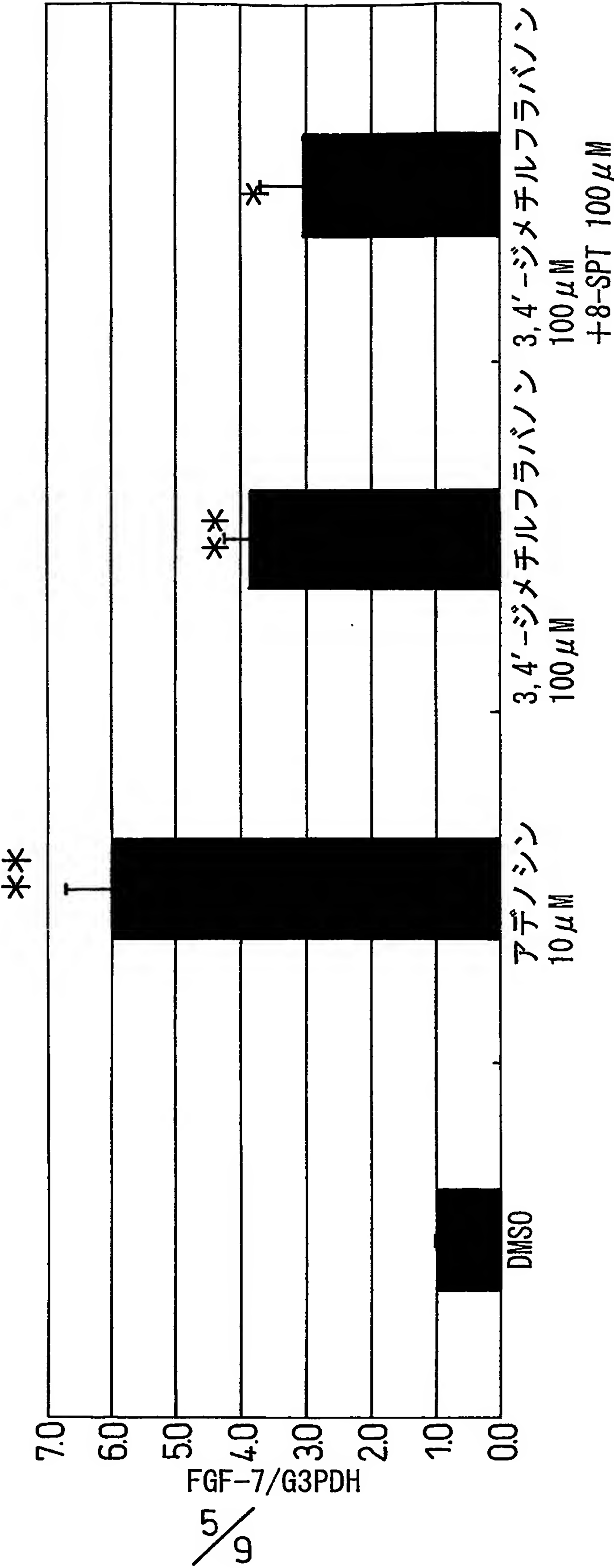


Fig.6

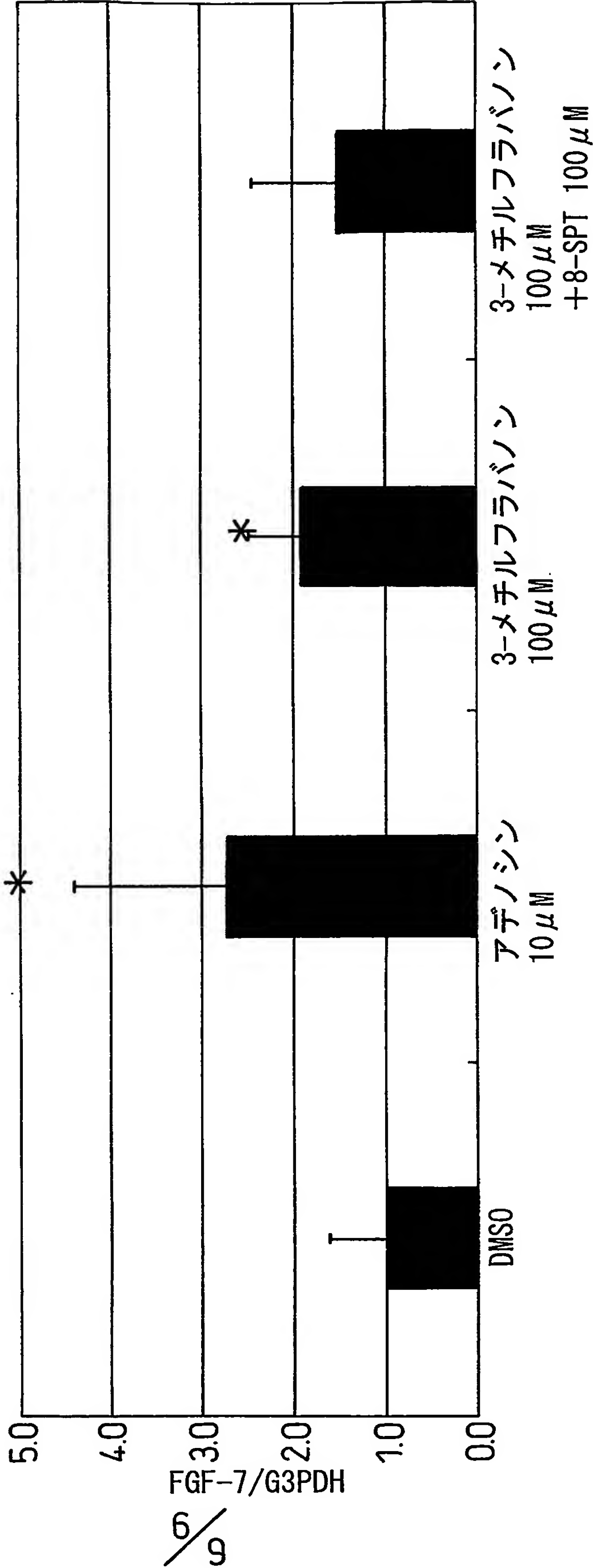


Fig.7

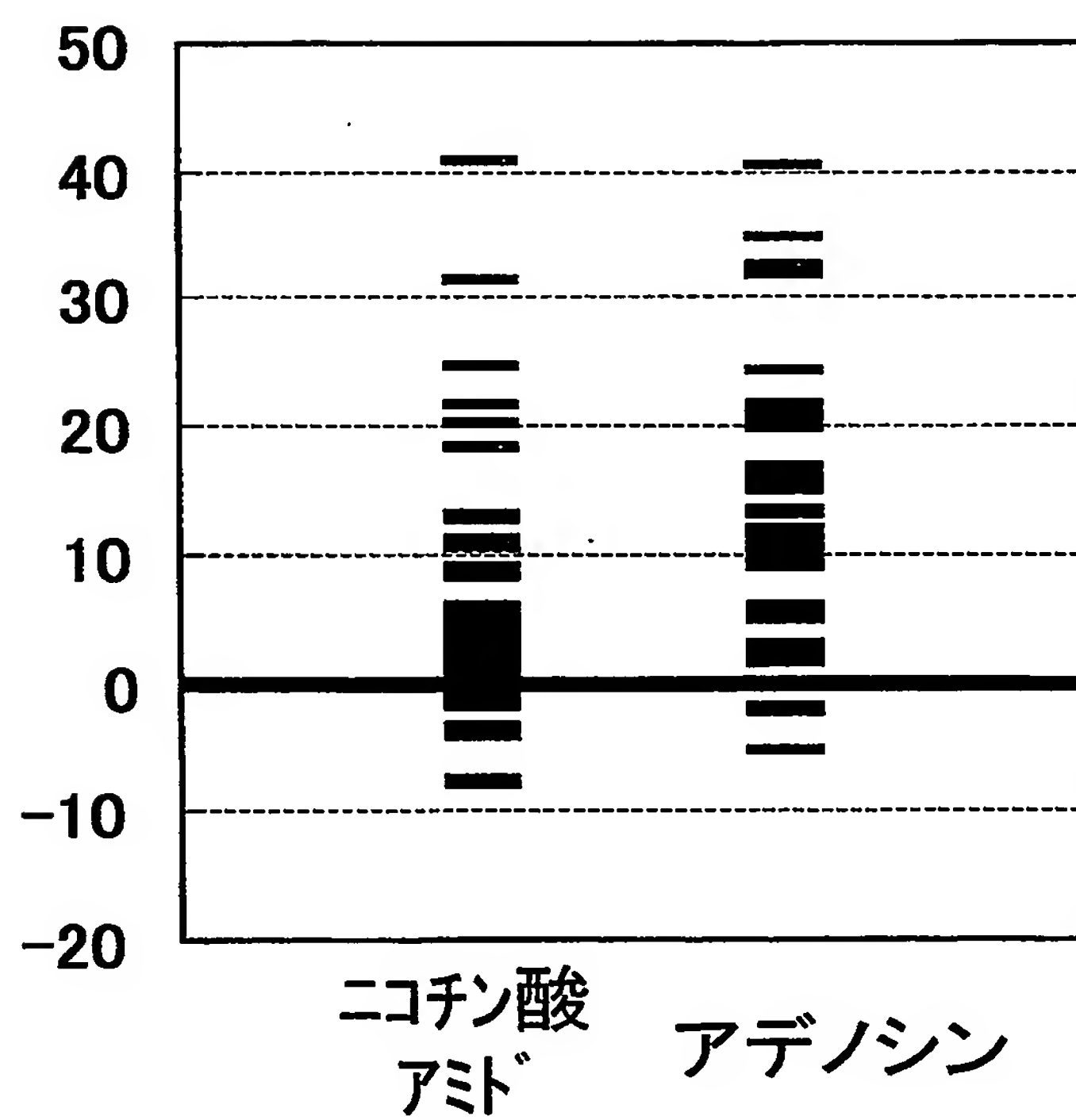


Fig. 8

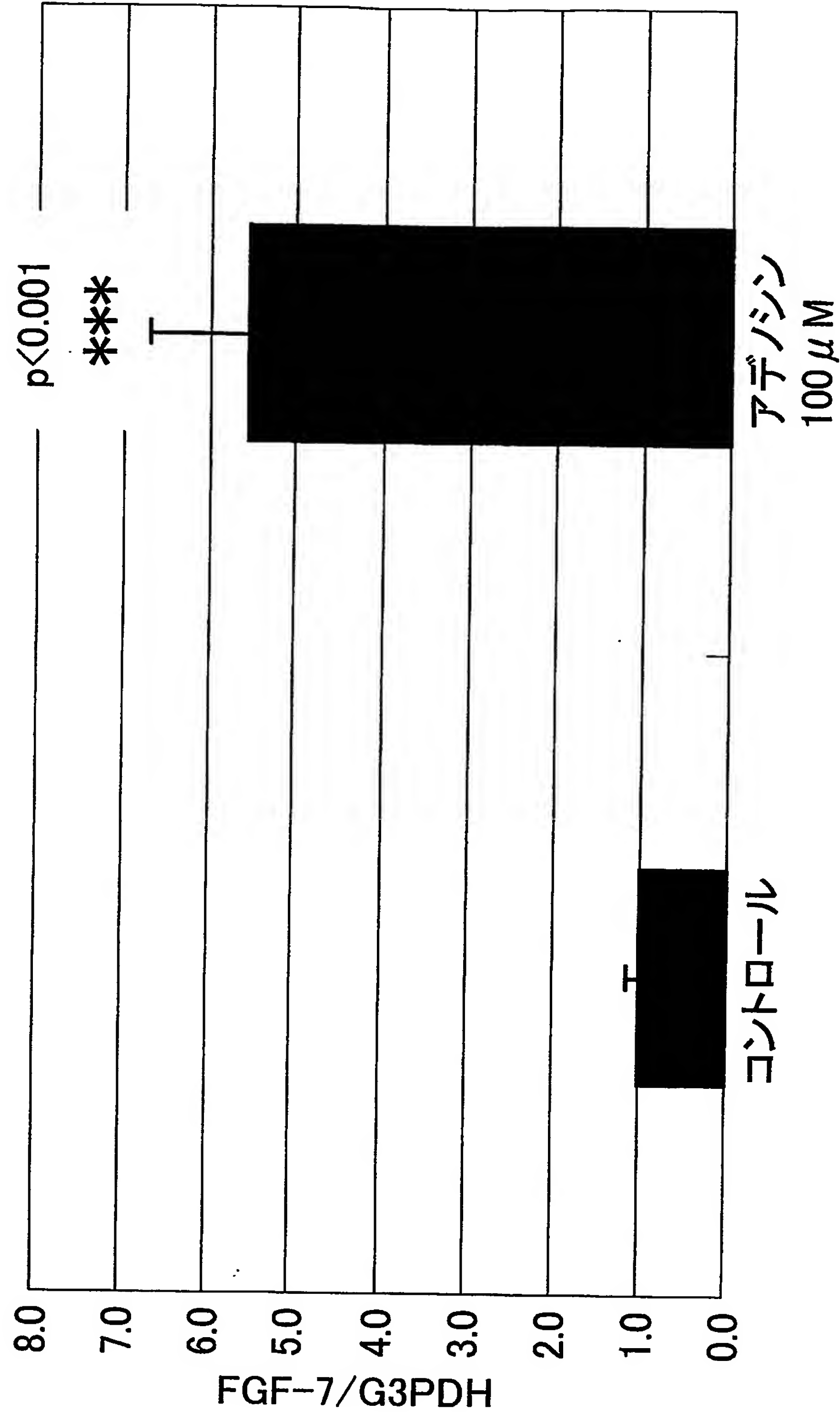
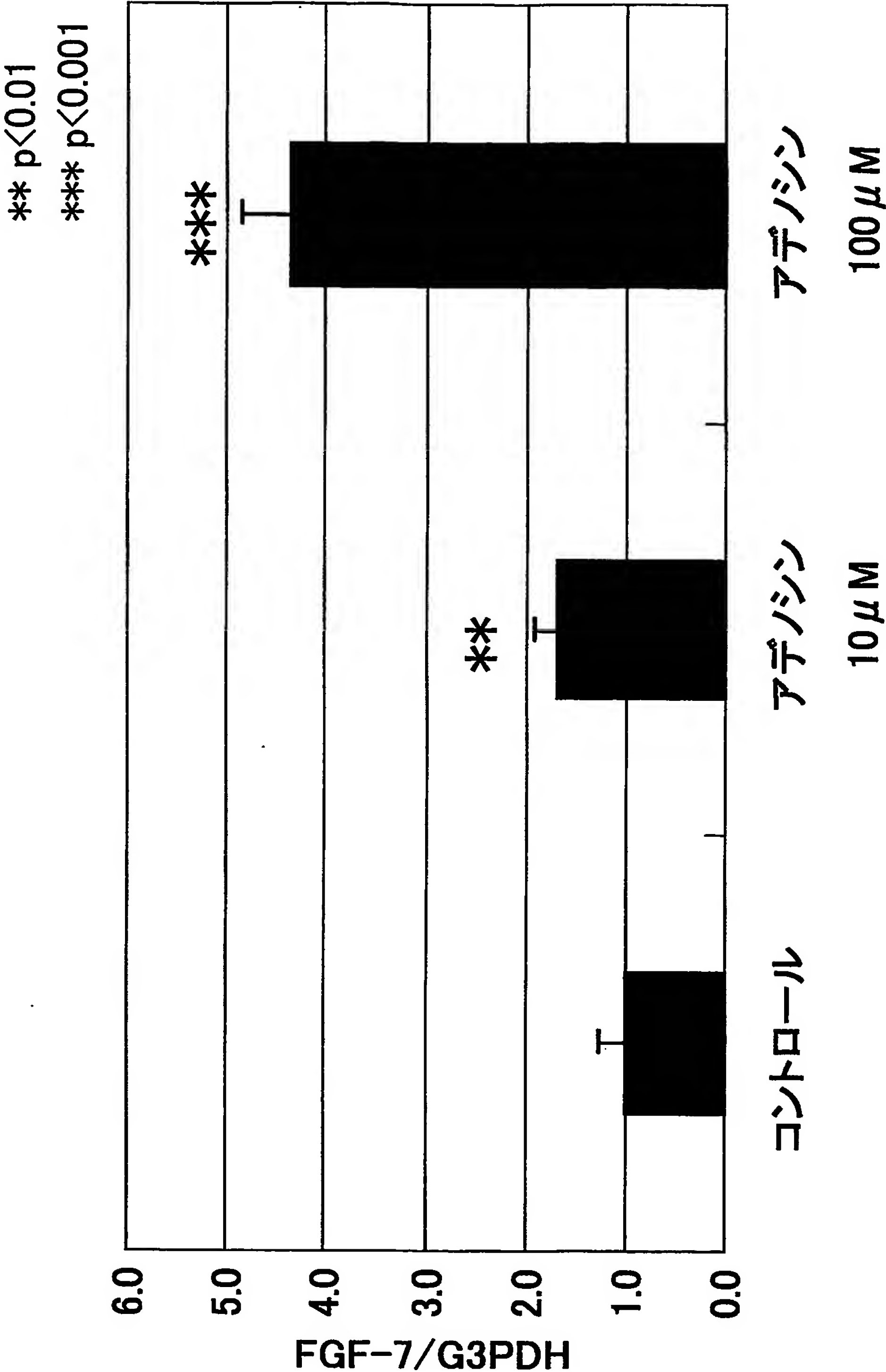


Fig.9



SEQUENCE LISTING

<110> SHISEIDO COMPANY, LTD.

<120> Method and Composition for Thickening Hair

<130> P907

<150> JP2003-381470

<151> 2003-11-11

<160> 6

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Forward Primer

<400> 1

catgaacacc cggagcacta c

21

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Reverse Primer

<400> 2

cactgtgttc gacagaagag tcttc

25

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Forward Primer

<400> 3

cacaaatgga tactgacatg ga

22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Reverse Primer

<400> 4
tcactcttat atccccctcct tc 22

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Forward Primer

<400> 5
ctttgctcta cagatcatgc tttc 24

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Reverse Primer

<400> 6
ttgcatagg aagaaagtgg gctg 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Leon L. Sun et al., Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth, Journal of Surgical Research, 1999, Vol.87, No.1, pages 14 to 24	5-7 8-10
X A	EP 998907 A1 (Shiseido Co., Ltd.), 10 May, 2000 (10.05.00), Full text & JP 2000-198718 A	5-7 8-10
X A	DE 4323616 A (Schreiner Edelgard), 19 January, 1995 (19.01.95), Full text (Family: none)	5-7 8-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 December, 2004 (16.12.04)

Date of mailing of the international search report
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017037

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/47172 A1 (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 August, 2000 (17.08.00), Full text & JP 2000-297015 A	5-7 8-10
X A	EP 387757 A2 (Bioresearch S.p.A.), 19 September, 1990 (19.09.90), Full text & JP 3-63225 A	5-7 8-10
X A	JP 2-311411 A (Kose Cosmetic Co., Ltd.), 27 December, 1990 (27.12.90), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 64-42416 A (Hoyu Co., Ltd.), 14 February, 1989 (14.02.89), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2-204406 A (Kabushiki Kaisha Mirubon), 14 August, 1990 (14.08.90), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 63-101307 A (Lion Corp.), 06 May, 1988 (06.05.88), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2003-155218 A (Lion Corp.), 27 May, 2003 (27.05.03), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2001-288047 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2001-288046 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2001-288043 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017037

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2001-288042 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2001-288045 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	JP 2001-288048 A (Shiseido Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text (Family: none)	5-7 8-10
X A	Pierce G.F. et al., Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor, Journal of experimental medicine, 1994, Vol.179, No.3, pages 831 to 840	8-10 5-7
X A	Rosenquist T.A. et al., Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle, Developmental dynamics: an official publication of the American association of anatomists, 1996, Vol.205, No.4, pages 379 to 386	8-10 5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017037

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-4

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 4 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K7/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K7/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992

日本国公開実用新案公報 1971-1992

日本国登録実用新案公報 1994-1996

日本国実用新案登録公報 1996-2004

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Leon L. Sun et al, Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth, Journal of Surgical Research, 1999, Vol. 87, No. 1, pp.14-24	5-7
A		8-10
X	EP 998907 A1 (Shiseido Company Limited) 2000.05.10 全文 & JP 2000-198718 A	5-7
A		8-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.12.2004

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岩下 直人

4C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3402

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DE 4323616 A (Schreiner Edelgard)	5-7
A	1995. 01. 19 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	WO 00/47172 A1 (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.)	5-7
A	2000. 08. 17 全文 & JP 2000-297015 A	8-10
X	EP 387757 A2 (Bioresearch S.p.A.)	5-7
A	1990. 09. 19 全文 & JP 3-63225 A	8-10
X	JP 2-311411 A (株式会社小林コーセイ)	5-7
A	1990. 12. 27 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 64-42416 A (ホーユー株式会社)	5-7
A	1989. 02. 14 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2-204406 A (株式会社ミルボン)	5-7
A	1990. 08. 14 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 63-101307 A (ライオン株式会社)	5-7
A	1988. 05. 06 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2003-155218 A (ライオン株式会社)	5-7
A	2003. 05. 27 全文 (ファミリーなし)	8-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-288047 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2001-288046 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2001-288043 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2001-288042 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2001-288045 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	JP 2001-288048 A (株式会社資生堂)	5-7
A	2001. 10. 16 全文 (ファミリーなし)	8-10
X	Pierce G. F. et al, Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor,	8-10
A	Journal of experimental medicine, 1994, Vol. 179, No. 3, pp. 831-840	5-7
X	Rosenquist T. A. et al, Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle : expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle, Developmental dynamics : an official publication of the American association of anatomists, 1996, Vol. 205, No. 4, pp. 379-386	8-10
A		5-7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-4 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲1-4は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるの
で、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査
することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に
従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求
の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追
加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載
されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.